

Method for determining an active agent dose

Publication number: DE10345837

Publication date: 2005-04-21

Inventor: SCHMITT WALTER (DE); WILLMANN STEFAN (DE);
DIESEL EDGAR (DE); DORN INGMAR (DE);
BURMEISTER JENS (DE)

Applicant: BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH (DE)

Classification:









- **international:** **G06Q10/00; G06Q10/00;** (IPC1-7): C12Q1/68

- **European:**

Application number: DE20031045837 20031002

Priority number(s): DE20031045837 20031002

Also published as:

 WO2005033334 (A3)
 WO2005033334 (A2)
 EP1671250 (A3)
 EP1671250 (A2)
 US2005074803 (A1)
 EP1671250 (A0)
 CA2540789 (A1)
 AU2004278478 (A1)

less <<

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE10345837

Abstract of corresponding document: **US2005074803**

Method for determining the dose of at least one active agent based on a genetic analysis. The method comprises analyzing specific genes for their nucleotide sequence or their expression levels of gene-specific proteins and/or RNA molecules. The gene-specific data is assigned one or more relevant physiological functions of the human or animal body, in particular those which have an influence on the metabolism, absorption, excretion or distribution of the active agent in the body. The gene-specific data and the assigned physiological functions are then integrated into a physiology-based pharmacokinetic model (PBPK model). The PBPK model integrates pharmacokinetic data relating to one or more active agents. The PBPK model may also receive and evaluate patient-specific data directly inputted and combined with data from a knowledge database comprising known values of pharmacokinetic parameters. The PBPK's integration of these data provide a calculation of the individual dose of the active agent.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 103 45 837 A1 2005.04.21

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 103 45 837.9

(22) Anmeldetag: 02.10.2003

(43) Offenlegungstag: 21.04.2005

(51) Int Cl.⁷: C12Q 1/68

(71) Anmelder:

**Bayer Technology Services GmbH, 51373
Leverkusen, DE**

(72) Erfinder:

**Schmitt, Walter, Dr., 41470 Neuss, DE; Willmann,
Stefan, Dr., 40589 Düsseldorf, DE; Dießel, Edgar,
Dr., 51061 Köln, DE; Dorn, Ingmar, Dr., 50733 Köln,
DE; Burmeister, Jens, Dr., 51061 Köln, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Bestimmung einer Wirkstoffdosierung**

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Bestimmung der Dosierung von mindestens einem Wirkstoff auf Basis einer genetischen Analyse beschrieben. Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

a) Analyse (101) von spezifischen Gensequenzen, mittels eines gensequenz-spezifischen Analysengerätes, insbesondere eines sequenz-spezifischen Sensors, oder Bestimmung der Expression von Proteinen entweder über RNA Transkription mittels quantitativer RNA-spezifischer Nachweismethoden oder direkte Messung der Proteinexpression durch ein Protein-Analysegerät,

b) Zuordnung der Gensequenzen zu physiologischen Funktionen des menschlichen oder tierischen Körpers, insbesondere solchen physiologischen Funktionen, die Einfluss auf den Abbau, auf die Aufnahme, auf die Abgabe oder auf das Verteilungsverhalten des Wirkstoffes im Körper haben,

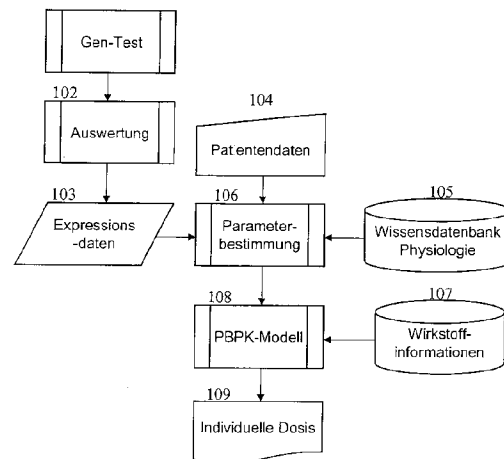
c) Weitergabe der genetischen und der Zuordnungsdaten an ein physiologie-basiertes pharmakokinetisches Modell (PBPK-Modell) (108),

d) Eingabe von Wirkstoff-spezifischen Daten in das PBPK-Modell (108),

e) Eingabe von charakteristischen Patientendaten, gegebenenfalls aus direkten Messungen am Körper,

f) Berechnung von für das PBPK-Modell notwendigen physiologischen Einflussparametern aus den Patientendaten unter Verwendung von in der Wissensdatenbank enthaltenen Informationen und Weitergabe der Parameter an das PBPK-Modell (108),

g) Berechnung der individuellen Dosis aus den Daten nach den Schritten c), d) und f) unter Verwendung des PBPK-Modells (108).



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der individuellen Dosierung von Arzneimitteln, für die bekannt ist, dass ihre Wirkung durch eine von individuellen Faktoren der Patienten abhängige Pharmakokinetik und/oder Pharmakodynamik beeinflusst wird. Das Verfahren kann je nach Ausführung sowohl als Point of Care Lösung direkt in der Klinik oder Arztpraxis oder als spezielle Methode im Labormedizinischen Bereich zum Einsatz kommen.

Stand der Technik

[0002] Die therapeutische Wirkung von Medikamenten wird sowohl von der intrinsischen, biochemischen Wirkung des Wirkstoffs direkt am biologischen Zielmolekül, als auch von der Konzentration am Wirkort bestimmt. Die Konzentration am Wirkort wird wiederum von verschiedenen Faktoren wie absorbiertem Anteil bei oraler Verabreichung, Verteilung im Körper und Geschwindigkeit des metabolischen Abbaus und der Ausscheidung beeinflusst. Diese Prozesse hängen stark von physiologischen und anatomischen Eigenschaften des Körpers des behandelten Patienten ab. Im einzelnen sind dabei zu nennen:

- Volumina und Fettgehalt der einzelnen Organe oder als zusammengefasster Parameter das Körpergewicht und der Körperfettgehalt.
- Blutflussraten in den einzelnen Organen.
- Funktion des Magen-Darm-Traktes
- Funktion der Ausscheidungsorgane wie Niere wie Gallentrakt.
- Expression und Funktion von Abbauenzymen, insbesondere in Leber und Darm
- Expression und Funktion von Proteinen für den aktiven Transport von Molekülen durch Zellmembranen

[0003] Da alle diese Eigenschaften aufgrund von genetischer Veranlagung, Gesundheitszustand oder Einfluss anderer Medikamente von Individuum zu Individuum schwanken können, und damit auch die Konzentration des Wirkstoffs im Körper, kommt es auch bei der Wirkung von Medikamenten zu individuellen Unterschieden. Diese können je nach Eigenschaft des Wirkstoffs unterschiedlich stark sein. Es ist bekannt, dass bei manchen Wirkstoffen bei 50 % der Anwendungen keine therapeutische Wirkung erreicht werden kann. Die derzeitige Vorgehensweise bei Beginn einer Therapie ist, die Verabreichung der Standarddosis und die darauffolgende Beobachtung des Patienten. Gegebenenfalls wird bei Nichteintritt eines Therapieerfolges versucht diesen durch schrittweise Erhöhung der Dosis zu erreichen. Diese Vorgehensweise ist uneffektiv und kann zur Gefährdung des Patienten führen. Letzteres gilt insbesondere auch für Fälle, in denen die Konzentration im Körper aufgrund individueller Faktoren wesentlich höher ausfällt als im Normalfall, sodass es zu unerwünschten Nebenwirkungen kommt.

[0004] Der Zusammenhang zwischen den individuellen Eigenschaften des Körpers und dem Verhalten eines pharmazeutischen Wirkstoff ist in vielen Fällen zumindest qualitativ bekannt. Besonderheiten mancher Einflussfaktoren, wie Körpergewicht oder Blutflussraten sind durch den behandelnden Arzt leicht diagnostizierbar (Gewicht) oder durch medizinisches Wissen, z.B. über Änderungen der Durchblutung bei Vorliegen einer Krankheit, abschätzbar. Dem Einfluss des Körpergewichts wird in manchen Fällen durch Verabreichung einer gewichtsspezifischen Dosis Rechnung getragen. Die derzeitigen Methoden lassen aber im Prinzip nur eine qualitative Berücksichtigung der individuellen Gegebenheiten zu.

[0005] Im Fall des Einflusses von aktiven, biochemischen Prozessen ist die Lage wesentlich komplizierter. Hier kann es zu Veränderungen der Effektivität der Prozesse durch unterschiedlich ausgeprägtes Vorhandensein der entsprechenden Proteine aufgrund genetischer Veranlagung, Krankheit oder externe Einflüsse, wie z.B. andere Wirkstoffe kommen. Auch die Funktion der Proteine kann bei gleicher Expression z.B. durch genetisch bedingte Änderung der Proteinstruktur oder Wechselwirkung mit anderen Substanzen beeinflusst sein (vergl.: J. Licinio, M. Wong (Eds.), "Pharmacogenomics", Wiley-VCH, Weinheim 2002; A. D. Rodrigues, "Drug-Drug Interactions", Marcel Dekker, 2002).

[0006] Die Wechselwirkung mit anderen Substanzen, insbesondere gleichzeitig verabreichten anderen Wirkstoffen oder Nahrungsbestandteilen ist primär substanzabhängig und kann bei ausreichender Charakterisierung der Substanzen zumindest qualitativ vorhergesagt werden. Für die wichtigsten Proteine existieren Listen von Substanzen, die deren Funktion entweder direkt oder durch Induktion oder Hemmung der Expression beeinflussen (vergl.: A. Schinkel, J. W. Jonker "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview", Advanced Drug Delivery Reviews 55, 3-29 (2003); 1 Cytochrome P450 Drug Interaction Table: <http://medicine.iupui.edu/flockhart>). In der Regel sind Einflüsse auf den zu betrachtenden Wirkstoff untersucht und in Form einer Kontraindikation in der Produktinformation vermerkt.

[0007] Schwieriger zu erfassen ist der Effekt durch die hinsichtlich der Struktur und Menge unterschiedliche Protein-Zusammensetzung der verschiedenen Organe eines bestimmten Patienten zum Zeitpunkt der Therapie. Hierzu müsste im Prinzip die Expression eines bestimmten Proteins im betroffenen Organ bestimmt werden, was in der Regel nicht möglich ist, da keine entsprechenden Gewebeproben vorliegen. Es ist aber heute bekannt, dass Unterschiede in der Expression sowohl hinsichtlich der exprimierten Menge als auch der Proteinstruktur unter anderem auf Punktmutationen (Austausch einzelner Nukleotide in der genomischen DNA, sogenannte Single Nucleotide Polymorphisms „SNPs“) zurückzuführen sind. SNPs können sich in den für das Protein kodierenden oder in den die RNA-Transkription und damit auch die Expression des Proteins regulierenden DNA-Sequenzen befinden. Daneben sind andere Arten von Mutationen (z.B. Insertionen, Deletionen) bekannt, die die Expression von Proteinen verändern können. Zudem ist bekannt, dass der genomischen DNA aufgeprägte Methylierungsmuster die Transkription/Expression verändern können. Derartige genomische Marker wie z.B. SNPs lassen sich auf DNA-Ebene im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachweisen. In verschiedenen Fällen sind bereits speziell auf diesen Nachweis ausgelegte Verfahren, z.B. Biochips oder PCR-basierte Nachweisverfahren in der Entwicklung oder auf dem Markt. Dies eröffnet die Möglichkeit einer angepassten Dosierung auf Grundlage eines entsprechenden DNA-Tests direkt in der Arztpraxis oder als Labormethode. Für viele ADME-relevante Proteine liegen Informationen über die im Menschen auftretenden zugehörigen Gensequenzen und deren Modifikationen vor (vergl.: SNP-Datenbank im Internet verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Zu einem großen Teil ist auch die Auswirkung der einzelnen Modifikationen auf die ADME-relevante Funktion bekannt (vergl.: R. G. Tirona, R. B. Kim "Pharmacogenomics of Drug Transporters" in J. Licinio, M. Wong (Eds.), "Pharmacogenomics", Wiley-VCH, Weinheim 2002).

Aufgabenstellung

[0008] Ein entscheidendes Problem bei der Bestimmung der optimalen individuellen Dosierung ist die gleichzeitige, komplexe Abhängigkeit der intrakorporalen Konzentration von verschiedenen Einflussfaktoren. Während eine einzelne Abhängigkeit noch experimentell bestimmt und zum Beispiel in Tabellenform für eine Dosierungsentscheidung verwendet werden kann, ist dies bei mehreren, sich gegenseitig beeinflussenden Abhängigkeiten in der Regel höchstens qualitativ möglich. Diese Problematik lässt sich aber durch Verwendung einer computergestützten Simulation zur Berechnung der Konzentrationen beheben. Eine hierfür geeignete Methode ist die sogenannte Physiologiebasierte Pharmakokinetische (PBPK) Simulation, mit der das Aufnahme-, Distributions-, Metabolisierungs- und Exkretionsverhalten (ADME) von Xenobiotika im Säugetierkörper auf Grundlage der physiologischen Voraussetzungen detailliert beschrieben werden kann. Für einfache Fragestellungen, die nur passive Verteilungsprozesse im Körper berücksichtigen ist diese Methode schon lange bekannt und ausgiebig beschrieben (vergl.: G. E. Blakey, I. A. Nestorov, P. A. Arundel, L. A. Aarons, M. Rowland "Quantitativ Structure-Pharmacokinetics Relationships: 1. Development of a Whole Body Physiologically Based Model to Characterize Changes in Pharmacokinetics Across a homologous Series of Barbiturates in the Rat", J. Pharmacokin. and Biopharm. 25, 277-312 (1997); R. Kawai, M. Lemaire, J.-L. Steiner, A. Bruelisauer, W. Niederberger, M. Rowland, "Physiologically Based Pharmacokinetic Study on a Cyclosporin Derivative, SDZ IMM 125", J. Pharmacokin. and Biopharm. 22, 327-365 (1994)). Einige bekannte Modelle beschreiben zusätzlich den Metabolismus und auch den aktiven Transport in verschiedenen Organen als sättigbare, nicht dosislineare Prozesse. Ein Simulationsmodell, das durchgängig die Beschreibung solcher Prozesse in allen relevanten Organen des Körpers berücksichtigt wird bei der PBPK-Simulationssoftware PK-Sim (Bayer Technology Services GmbH) verwendet.

[0009] Die hier beschriebene Erfindung betrifft ein System aus der Kombination von einem Nachweissystem zur Bestimmung der ADME-relevanten genetischen Veranlagung des Patienten, einer PBPK/PD-Simulation und einer Datenbank für Stoffeigenschaften (**Fig. 1**), das geeignet ist, dosisbezogen die individuelle Konzentration im Körper zu berechnen und aus dem Ergebnis die optimale individuelle Dosis vorzuschlagen.

[0010] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Dosierung von mindestens einem Wirkstoff auf Basis einer genetischen Analyse mit folgenden Schritten:

- a) Analyse (**101**) von spezifischen Gensequenzen, mittels eines gensequenzspezifischen Analysengerätes, insbesondere eines sequenz-spezifischen Sensors, oder Bestimmung der Expression von Proteinen entweder über RNA Transkription mittels quantitativer RNA-spezifischer Nachweismethoden oder direkte Messung der Proteinexpression durch ein Protein-Analysegerät
- b) Zuordnung der Gensequenzen zu physiologischen Funktionen des menschlichen oder tierischen Körpers, insbesondere solchen physiologischen Funktionen, die Einfluss auf den Abbau, auf die Aufnahme, auf die Abgabe oder auf das Verteilungsverhalten des Wirkstoffes im Körper haben,
- c) Weitergabe der genetischen und der Zuordnungsdaten an einen physiologiebasiertes Pharmakokinetisches Modell (PBPK-Modell) (**108**),

- d) Eingabe von Wirkstoff-spezifischen Daten in das PBPK-Modell (108),
- e) Eingabe von charakteristischen Patientendaten, gegebenenfalls aus direkten Messungen am Körper oder in ein Rechnersystem (104),
- f) Berechnung von für das PBPK-Modell notwendigen physiologischen Einflussparametern aus den Patientendaten unter Verwendung von Informationen aus physiologischen Wissensdatenbanken und Weitergabe der Parameter an das PBPK-Modell (108),
- g) Berechnung der individuellen Dosis aus den Daten nach den Schritten c), d) und f) unter Verwendung des PBPK-Modells (108).

[0011] Durch die Gen-Test-Methode (101) wird die genetische Veranlagung des Patienten bezüglich der für das ADME-Verhalten von Wirkstoffen wichtigen Gene oder Proteine bestimmt.

[0012] Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Gensequenzen ausgewählt sind aus solchen die die Proteine der Reihe:

Metabolisierende Enzyme, insbesondere Monooxygenasen der Cytochrome P 450 Familie, Phase II Enzyme, die polare Gruppen an die auszuscheidenden Moleküle anhängen, Aktive Transporter, insbesondere Multidrug Resistance Proteine z.B. P-Glycoprotein Familie oder Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP) oder Organic Anion Transporting Polypeptide Familie (OATP) oder Organic Anion Transporter Familie (OAT) oder Organic Cation Transporter Familie (OCT), oder Novel Organic Cation Transporter Familie (OCTN) oder Peptide Transporter Familie (PepT), oder Plasma Bindungs Proteine, insbesondere Serum Albumin und Glycoproteine betreffen.

[0013] Die wirkstoffspezifischen Daten sind besonders bevorzugt solche, die ausgewählt sind aus der Reihe: Organ/Blut-Verteilungskoeffizienten, Membranpermeabilität, kinetische Konstanten der Metabolisierungsprozesse und/oder der aktiven Transportprozesse.

[0014] Die charakteristischen Patientendaten gemäß Schritt e) sind besonders bevorzugt ausgewählt aus der Reihe:

Körpergewicht, Körperoberfläche, Körperfettgehalt, Alter oder Geschlecht, vom Normalzustand z.B. krankheitsbedingt abweichende physiologische Funktionen wie beispielsweise renale oder hepatische Unterfunktion, Co-Medikation.

[0015] Die physiologischen Einflussparameter gemäß Schritt f) sind besonders bevorzugt ausgewählt aus der Reihe:

Durchflussrate Q_x von Blut durch das Organ X, Volumen V_x des Organs X oder Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt ($PxSA_x$) für das Organ X.

[0016] Bevorzugt ist das PBPK-Modell ein Simulationsprogramm, das wenigstens die folgenden Funktionen simuliert: Darmaufnahme Bluttransport, Verteilung in Organe durch Permeation oder aktiven Transport, Metabolisierung, Ausscheidung über Urin oder Galle.

[0017] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Vorrichtung zur Bestimmung der Dosierung von Wirkstoffen, insbesondere nach dem erfindungsgemäßen oben beschriebenen Verfahren, aufweisend wenigstens ein gensequenz-spezifisches Analysengerät (101), eine hiermit verbundene Rechneinheit mit einem Programm umfassend ein pharmakokinetisches Modell (108), einer Wissensdatenbank (105) und Eingabemodulen (104) für Patientendaten, dadurch gekennzeichnet, dass als pharmakokinetisches Modell (108) das PBPK-Modell(108) eingesetzt wird.

[0018] Die wichtigsten ADME-relevanten Proteine sind:

- Metabolisierende Enzyme: Monooxygenasen der Cytochrome P 450 Familie; Phase II Enzyme die polare Gruppen an die auszuscheidenden Moleküle anhängen.
- Aktive Transporter: Multidrug Resistance (P-Glycoprotein Familie) (MDR), Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP), Organic Anion Transporting Polypeptide Familie (OATP), Organic Anion Transporter Familie (OAT), Organic Cation Transporter Familie (OCT), Novel Organic Cation Transporter Familie (OCTN), Peptide Transporter Familie (PepT)
- Plasma Bindungs Proteine: Insbesondere Serum Albumin und Glycoproteine

[0019] Für viele dieser Proteine sind Variationen in der genetischen Kodierung bekannt, die unterschiedlich häufig auftreten und unterschiedlich starken Einfluss auf die Funktion der Proteine und damit das ADME-Verhalten eines Wirkstoffs haben.

[0020] Neben dem direkten Einfluss über ADME-relevante Proteine ist auch ein Einfluss durch genetisch bedingte krankhafte Zustände möglich, die indirekt einen für das ADME-Verhalten wichtigen Prozess beeinflussen. Auch solche genetischen Voraussetzungen können in die Gen-Untersuchung einbezogen werden, wenn der Zusammenhang zum Wirkstoffverhalten untersucht und im PBPK/PD-Modell beschreibbar ist.

[0021] Die Gen-Test-Methode (**101**) selbst kann zum Beispiel eine Methode zur direkten Bestimmung der Expression der relevanten Proteine im Organgewebe, der Transkription relevanter RNA Moleküle oder aber eine Methode zur Detektion von SNPs der DNA aus Proben von Körperflüssigkeiten sein. Bevorzugt handelt es sich dabei um eine Biochip- oder PCR-basierte Anwendung.

[0022] Die Ergebnisse des Gen-Test werden nach einer testspezifischen Methode ausgewertet (**102**) um die benötigten Informationen über die Beeinflussung von ADME-relevanten Prozessen zu erhalten. So wird entweder direkt das Expressions-Level der Proteine oder im Fall der DNA-Analyse über bekannte Zusammenhänge die Auswirkung auf die Funktion oder Expression des entsprechenden Proteins bestimmt. Genomische Marker wie z.B. SNPs können auch zur Einteilung von Patienten in bestimmte Gruppen wie z.B. schnell oder langsam metabolisierende Patienten verwendet werden. Derzeit wird auch nach genomischen Markern gesucht, die die Einteilung von Patienten in Responder/Non-Responder oder Patienten mit und ohne erwartete Nebenwirkungen bezogen auf bestimmte Medikamente oder Gruppen von Medikamenten ermöglichen. Der sich so ergebende Datensatz (**103**) wird dem PBPK/PD-Modell (**108**) als Eingangsdaten übergeben.

[0023] Weitere patientenspezifische Daten, die für die Dosisberechnung relevant sind (**104**), sind manuell einzugeben. Bei diesen Daten handelt es sich um Informationen, die sich durch Messung, Exploration oder Anamnese erheben lassen. Einige Beispiele sind: Körpergewicht oder Körperoberfläche, Körperfettgehalt, Alter, Geschlecht. Die sich aufgrund dieser Daten ergebenden Parameterwerte des PBPK/PD-Modells werden in einem nachfolgenden Schritt (**106**) unter Zuhilfenahme einer Wissensdatenbank (**105**) über die zugrunde liegenden Zusammenhänge berechnet. Diese Wissensdatenbank kann z.B. auch Informationen über den Einfluss bestimmter Krankheiten auf ADME-relevante Prozesse enthalten.

[0024] Eine mögliche Ausführungsform des Moduls für die manuelle Eingabe der Patientendaten könnte ein Eingabegerät mit menügeführte Nutzeroberfläche sein, die dynamisch angepasst, abhängig von den eingegebenen Information weitere benötigte Daten abfragt.

[0025] Die für die Simulation des ADME-Verhalten benötigten wirkstoff-spezifischen Daten für das zu verabreichende Medikament sind in einer weiteren Datenbank (**107**) abgelegt. Bei diesen Daten handelt es sich um die im PBPK/PD-Modell enthaltenen, von den physiko- und biochemischen Eigenschaften des Wirkstoff abhängigen Parameterwerte. Diese wurden vorab direkt experimentell oder durch Anpassung des Simulationsmodells an pharmakokinetische und/oder pharmakodynamische Daten bestimmt. Beispiele dieser Daten sind Organ/Blut-Verteilungskoeffizienten, Membranpermeabilitäten und die kinetischen Konstanten der Metabolisierungsprozesse und der aktiven Transportprozesse.

[0026] Die zentrale Einheit des Systems ist das PBPK/PD-Simulationsmodell mit dem die eigentliche Berechnung der intrakorporalen Konzentrationen erfolgt. Der typische Aufbau eines PBPK-Modells ist in **Fig. 2** gezeigt. Die prinzipielle Vorgehensweise ist, den Körper in einzelne Kompartimente zu unterteilen und den Austausch von Wirkstoff-Substanz zwischen diesen Kompartimenten mit Hilfe von Massenerhaltungsgleichungen⁷⁾ zu beschreiben. Als Kompartimente werden sinnvollerweise die einzelnen Organe gewählt. Gegebenenfalls müssen auch Teile der Organe als Unterkompartimente definiert werden, wenn entweder der Stofftransport zwischen diesen limitiert sein kann, oder Informationen über Konzentration separat gewonnen werden müssen.

[0027] Bei diesen Massenerhaltungsgleichungen handelt es sich um gewöhnliche Differentialgleichungen. Typischerweise haben sie die Form:

$$V_x \cdot \frac{dC_x}{dt} = Q_x \cdot C_{ar} - Q_x \cdot \frac{C_x}{K_x} \quad (\text{Gleichung 1})$$

V_x = Volumen des Organs X

C_x = Konzentration der Substanz in dem Organ X

Q_x = Durchflussrate von Blut durch das Organ X

C_{ar} = Konzentration der Substanz, die das Organ über das arterielle Blut erreicht

K_x = Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen Blut und Organ X im Gleichgewichtszustand

[0028] Sie beschreiben die Änderung der Konzentration im Organ X verursacht durch die mit dem Blutfluss Q_x in das Organ transportierte Menge, die Verteilung zwischen Blut und Organgewebe, bestimmt durch den Verteilungskoeffizienten K_x und die mit dem Blutfluss wieder aus dem Organ abtransportierte Menge.

[0029] Für viele Pharmawirkstoffe ist die Verteilung in die einzelnen Organe dadurch limitiert, dass sie langsamer durch die Zellmembranen permeieren als sie über das Blut ins Organ transportiert werden. In diesem Fall sind die Organe in verschiedene durch Membranen voneinander getrennte Unterkompartimente zu unterteilen und man erhält ein Modell entsprechend **Fig. 3**. Die zu berücksichtigenden Unterkompartimente sind Plasmavolumen (**301**), Rote Blutzellen (**302**), Interstitielles Volumen des Organgewebes (**304**) und Zellvolumen des Organgewebes (**306**). Rote Blutzellen und Zellen des Organgewebes sind von Membranen (**303**), (**305**) umschlossen durch die die Wirkstoffmoleküle permeieren müssen. Für die durch Membranen umschlossenen Kompartimente müssen in den Massenerhaltungsgleichungen für den Stofftransport Permeationsterme nach dem 2. Fick'schen Gesetz berücksichtigt werden. Diese haben allgemein die Form:

$$V_x^{cell} \cdot \frac{dC_x^{cell}}{dt} = P \times SA_x \cdot \left(C_x^{pl} - \frac{C_x^{cell}}{K_x} \right) \quad (\text{Gleichung 2})$$

V_x = Zellvolumen des Organs X

C_x^{pl} = Konzentration der Substanz im Blutplasma, die nicht gebunden ist

C_x^{cell} = Konzentration der Substanz in den Zellen des Organs

K_x = Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen Blut und Organ X im Gleichgewichtszustand

$P \times SA_x$ = Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt für das Organ x

[0030] Die aktiven Prozesse Metabolisierung und aktiver Transport können zum Beispiel durch sogenannte Michaelis-Menten-Terme berücksichtigt werden, die die Kinetik der biochemischen Reaktionen beschreiben. Eine Einbeziehung des aktiven Transports setzt ein permeationslimitiertes Modell, wie oben beschrieben, voraus. Ein detailliertes Organmodell inklusive der aktiven Prozesse ist in **Fig. 4** dargestellt. Einer oder mehrere Metabolisierungsprozesse (**401**) bewirken eine Abnahme der Konzentration der ursprünglichen Substanz. Die aktiven Transportprozesse (**402**), (**403**) werden so beschrieben, dass sie den Transport von Wirkstoffmolekülen über die Zellmembran, parallel zum passiven Permeationsprozess bewirken. Bei diesen Prozessen ist zu beachten, dass einwärtsgerichtete (**402**) von auswärtsgerichteten (**403**) zu unterscheiden sind. Entsprechend der **Fig. 4** ist Gleichung 2 wie folgt zu modifizieren.

$$V_x^{cell} \cdot \frac{dC_x^{cell}}{dt} = P \times SA_x \cdot \left(C_x^{pl} - \frac{C_x^{cell}}{K_x} \right) + \frac{v_{\max}^{in}}{(k^{in} + C_x^{pl})} \cdot C_x^{pl} - \frac{v_{\max}^{out}}{(k^{out} + C_x^{cell})} \cdot C_x^{cell} - \frac{v_{\max}^{metabol}}{(k^{metabol} + C_x^{cell})} \cdot C_x^{cell} \quad (\text{Gleichung 3})$$

[0031] Dabei sind:

$\frac{v_{\max}^{in}}{(k^{in} + C_x^{pl})} \cdot C_x^{pl}$ = Michaelis-Menten-Term zur Beschreibung der Kinetik des Einwärtstransportes.

$\frac{v_{\max}^{out}}{(k^{out} + C_x^{cell})} \cdot C_x^{cell}$ = Michaelis-Menten-Term zur Beschreibung der Kinetik des Auswärtstransportes.

$$\frac{V_{\max}^{\text{metabol}}}{(k_{\text{metabol}}^{\text{metabol}} + C_x^{\text{cell}})} \cdot C_x^{\text{cell}} = \text{Michaelis-Menten-Term zur Beschreibung der Kinetik der Metabolisierung}$$

V_{\max}^y = Maximalrate des Prozesses y

k^y = Bindungskonstante des Wirkstoffs am Protein das den Prozess y bewirkt

V_x = Zellvolumen des Organs X

$C_x^{\text{pl}} = \text{Konzentration der Substanz im Blutplasma, die nicht gebunden ist}$

$C_x^{\text{cell}} = \text{Konzentration der Substanz in den Zellen des Organs}$

$K_x = \text{Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen Blut und Organ X im Gleichgewichtszustand}$

$PxSA_x = \text{Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt für das Organ x}$

[0032] Nach dem gleichen Prinzip werden auch Organe mit spezielleren Funktionen beschrieben, wie z. B. der Magen-Darm-Trakt, die Niere, oder der Gallentrakt. Dabei sind in der Regel zusätzliche Parameter zu berücksichtigen, die die speziellen physiologischen Funktionen beschreiben. Im Fall des Darms ist zusätzlich die örtliche Variation von Größen wie $PxSA$ und pH-Wert des Darminhaltes zu berücksichtigen.

[0033] Über die Konzentrationen C_x sind die Massenerhaltungsgleichungen des in Gleichungen 1-3 beispielhaft dargestellten Typs für die einzelnen Kompartimente und Unterkompartimente entsprechend dem Schema in **Fig. 2** gegenseitig verknüpft. So ergibt sich ein System von abhängigen Differentialgleichungen in der Zeit, das für vorgegebene Anfangswerte numerisch gelöst werden kann. Die Lösungen dieses Gleichungssystems ergeben die Konzentrations-Zeit-Beziehungen für alle im Modell enthaltenen Kompartimente.

[0034] Zur Beschreibung einer pharmakologischen Wirkung kann weiterhin die Konzentrations-Zeit-Beziehung in dem Kompartiment, welches das biologische Target des Wirkstoffs enthält, mit einem pharmakodynamischen Effekt verknüpft werden. Typische Effektfunktionen sind z. B.:

- Hyperbolische oder sigmoide E_{\max} -Modelle:

$$\text{Effekt} = E_0 + \frac{E_{\max} C_x^y}{EC_{50}^y + C_x^y}$$

Effekt = pharmakologischer Wirkparameter (zeitabhängig)

E_0 = Basiswert des pharmakologischen Wirkparameters

E_{\max} = Maximalwert der pharmakologischen Wirkung

EC_{50} = Konzentration, bei der 50 % des maximalen Effekts erreicht sind

C_x = Konzentration am Wirkort (zeitabhängig)

y = Formparameter

- Potenzfunktionen: Effekt = $E_0 + \beta C_x^y$ bzw. Log-Linear Modelle:

$$\text{Effekt} = E_0 + \beta \ln(C_x)$$

Effekt = pharmakologischer Wirkparameter (zeitabhängig)

E_0 = Basiswert des pharmakologischen Wirkparameters

β = Parameter für die Steigung des Effekts als Funktion der Konzentration

C_x = Konzentration am Wirkort (zeitabhängig)

y = Formparameter

- Wirkstoffinteraktionsmodelle wie z. B. partieller oder vollständiger Antagonismus, etc.
- Kombinationen der vorgenannten Modelle, mit denen z. B. multiple Wirkzentren, oder Rezeptor-Transducer-Wechselwirkungen beschrieben werden können.

[0035] Die Arbeitsweise des gesamten Systems zur individuellen Dosisberechnung ist nun folgende. Zunächst müssen die individuellen Werte der Parameter des PBPK/PD-Modells, die von der Physiologie oder Anatomie abhängen, bestimmt werden. Dazu werden die Ergebnisse des Gen-Tests (**101**) ausgewertet und die Proteine identifiziert bei denen bzgl. Expression oder Funktion Abweichungen gegenüber der Normalpopulation zu erwarten sind (**102**). Für diese Proteine werden dann für die betroffenen Organe über bekannte und gespeicherte Relationen die Expression, bzw. die Effektivität bestimmt und entsprechend die v_{\max} - und k_m -Werte berechnet. Aus den sonstigen eingegebenen Daten des Patienten, z.B. Körpergewicht, Körperfettgehalt,

Geschlecht, Alter und ggf. Krankheitsbild werden unter Zuhilfenahme der zugehörigen in der Wissensdatenbank (**105**) hinterlegten Relationen die Parameter V, Q, K, P_xSA sowie weitere bei der Beschreibung spezieller Organe, wie Magen-Darm-Trakt, Niere etc. benötigte Parameter bestimmt. Dabei werden die in der Wirkstoff-Datenbank (**107**) hinterlegten Standardwerte der wirkstoffspezifischen Parameter berücksichtigt, die dann entsprechend den individuellen Gegebenheiten moduliert werden. Gegebenenfalls ist auch der genetische bzw. krankheitsbedingte Einfluss auf Eigenschaften wie z.B. die Zusammensetzung der Zellmembranen und pH-Werte einzelner Kompartimente zu berücksichtigen, die ebenfalls Permeabilitäten P_xSA und Verteilungskoeffizienten K beeinflussen können.

[0036] Ist der individuelle Parametersatz bestimmt, erfolgt die Simulation der Pharmakokinetik des zu verabreichenden Wirkstoffs mit der Standarddosierung. Nach wirkstoff- und therapiezielabhängigen Regeln, die ebenfalls in der Wirkstoffdatenbank hinterlegt sind wird dann anhand der berechneten Konzentrationsverläufe und ggf. des sich daraus ergebenden pharmakodynamischen Effekts entschieden, ob eine Anpassung der Dosis notwendig ist. Ist dies der Fall wird eine geeignetere Dosis vorgeschlagen. Diese wird durch lineare Umrechnung auf die im Körper zu erreichende optimale Dosis bestimmt, falls man sich im Regime der dosislinearen Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik befindet. Ist dies nicht der Fall wird durch automatische, schrittweise Änderung der Dosis in der Simulation dies an das Optimum angepasst. Das Ergebnis dieser Optimierungen wird von System ausgegeben und kann dann zur Festlegung der Dosis verwendet werden.

Erklärung der Figuren und Tabellen

[0037] Fig. 1: Prinzipieller Aufbau des Gesamten Systems zur Bestimmung der individuellen Dosierung.

[0038] Fig. 2: Prinzipbild des Aufbaus des physiologiebasierten pharmakokinetischen (PBPK-) Simulationsmodells Fig. 3: Zusammensetzung eines Organs im PBPK-Modell.

[0039] Fig. 4: Prinzip der Beschreibung von aktiven Transportern und Metabolisierungsprozessen im PBPK-Modell.

[0040] Fig. 5: Simulierte Konzentrations-Zeitkurve (Linie) im Blutplasma von Patienten mit CC Polymorphismus in Exon 26 (C3435T) im Vergleich zu experimentell bestimmten Werten (Punkte).

[0041] Fig. 6: Wie Fig. 5. Zusätzlich Konzentrationskurve für Patienten mit TT Polymorphismus in Exon 26 (C3435T) (graue Linie).

Tabelle 1:	Experimentelle und durch Simulation berechnete C _{max} -Werte für Verabreichung von 0,25 mg Digoxin in Patienten mit CC und TT Polymorphismus in Exon 26 (C3435T)
Tabelle 2:	Organvolumina und Blutflussraten
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Organe entsprechend Fig. 3
Tabelle 4:	Substanzabhängige Parameter für Digoxin
Tabelle 5:	Organspezifische substanzabhängige Parameter für Digoxin
Tabelle 6:	Michaelis-Menten-Konstanten für P-gp in der Darmwand

Ausführungsbeispiel

[0042] Im Folgenden wird ein Beispiel behandelt, das zeigt, wie der Einfluss genetischer Veranlagung für aktive Transporter auf die Pharmakokinetik von Wirkstoffen durch Simulationen beschrieben werden kann.

[0043] Das am besten untersuchte und in der Literatur beschriebene Transportprotein ist p-Glycoprotein (P-Gp), das neben anderen Organen insbesondere auch im Darm exprimiert wird und dort Einfluss auf die Absorption oral applizierter Wirkstoffe nehmen kann. Das zugehörige Gen wird in der Regel mit MDR1 benannt. MDR1 kann in verschiedenen Allelen vorliegen, wobei bekannt ist, dass diese zu unterschiedlicher Aktivität des zugehörigen Proteins führen (siehe Martin F. Fromm, The influence of MDR 1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans, Advanced Drug Delivery Reviews 54, 1295 (2002)). Für P-Gp sind Tabellen von pharmazeutischen Wirkstoffen veröffentlicht, welche Substrat für dieses sind (siehe z.B. C. J. Matheny et al., Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Implications of P-glycoprotein Modulation, Pharmacotherapy 21, 778 (2001)). Ein Beispiel für ein solches Substrat ist Digoxin. Für Digoxin ist bekannt, dass seine orale Absorption davon abhängt, welches Allel des MDR1 Gens vorliegt (siehe S. Hoffmeyer et al., Proc. Of the National Academy of Science USA, 97, 3473 (2000)). Konzentrations-Zeit-Kurven von Digoxin im Blutplasma für

Patienten mit normal funktionaler MDR1-Sequenz sind in A. John et al., Clinical Pharmacology & Therapeutics, 66, 339 (1999) veröffentlicht.

[0044] Es wurde ein PBPK-Modell entsprechend **Fig. 2** erstellt, mit dem. diese Konzentrationskurven durch Simulation beschrieben werden. In diesem Modell wird bei der Absorption der Substanz aus dem Darm neben der passiven Permeabilität der Darmwand auch ein aktiver Transportprozess in Richtung des Darmlumens berücksichtigt. Unter Verwendung der in Tabellen 2-6 aufgelisteten Parameterwerte liefert das Simulationsmodell eine nahezu exakte Beschreibung der experimentell bestimmten Plasma-Konzentrationskurve (**Fig. 5**).

[0045] Der in Tabellen 2-6 aufgeführte Parametersatz ist im Anwendungsfall in der Datenbank mit Wirkstoffinformationen (**107**) hinterlegt. Die Abschätzung des Einflusses von zum Beispiel abweichenden MDR1-Sequenzen kann dann durch entsprechende Änderung der dadurch betroffenen Parameter des Simulationsmodells erreicht werden. Diese Änderung wird unter Berücksichtigung der Expressionsdaten (**103**) im Schritt „Parameterbestimmung“ (**106**) durchgeführt.

[0046] Ein Beispiel für einen Datensatz, in dem das Expressionslevel von P-Gp in der Darmwand in Abhängigkeit vom MDR1 Polymorphismus bestimmt wurde, ist in S. Hoffmeyer (2000) zu finden. Das Expressionslevel bestimmt wiederum die maximale Geschwindigkeit V_{max} des Transportprozesses. Die Wissensdatenbank (**105**) enthält also im Anwendungsfall die Zuordnung von relativen V_{max} -Werten zu den Gensequenzen der verschiedenen Polymorphismen, die mit den substanzspezifischen absoluten V_{max} -Werten aus der Datenbank mit Wirkstoffinformationen (**107**) zu den im PBPK-Modell (**108**) zu verwendenden Parametern verrechnet werden.

[0047] In S Hoffmeyer et al., (2000) sind zusätzlich Daten über den Einfluss verschiedener Polymorphismen auf die Pharmakokinetik von Digoxin enthalten. So werden für den Polymorphismus in Exon 26 (C3435T) die in Tabelle 1 aufgelisteten C_{max} -Werte (Maximale Plasmakonzentration) angegeben.

[0048] Ausgehend von der oben dargestellten Simulation des „Wildtypen“ (C3435C) kann der Homozygote Typ TT durch Reduktion von V_{max} um 51 % entsprechend dem niedrigeren Expressionslevel simuliert werden. Das entsprechende Ergebnis wird in **Fig. 6** dargestellt. Die sich in der Simulation ergebende Erhöhung von C_{max} um 45 %, was der experimentell gefundenen Erhöhung von 30 % gut entspricht (siehe Tabelle 1).

[0049] Im Anwendungsfall würden sich aus der Simulation des Typs TT ergebenden C_{max} Werte mit in der Datenbank mit Wirkstoffinformationen (**107**) enthaltenen sicherheitskritischen Werten verglichen und gegebenenfalls eine reduzierte Dosierung vorgeschlagen. Um den Dosierungsvorschlag festzulegen werden z.B. Simulationen mit iterativ veränderten Dosierungen durchgeführt, bis die pharmakokinetischen Kenngrößen im sicheren Bereich liegen. In Fällen, in denen sicher ist, dass eine lineare Abhängigkeit von der Dosis besteht kann der Dosierungsvorschlag auch durch linear Umrechnung bestimmt werden.

Tabelle 1

Polymorphismus	Mittl. rel. Expressionslevel	C_{max} Experiment [ug/l]	C_{max} Simulaton [ug/l]
CC (Wildtyp)	1275	1,6	1,72
TT (Homozygot)	627	2,1	2,49

Tabelle 2

Organ	Volumina [ml]	Blutflussraten [ml/min]
Venöser Blutpool	250	4670
Arterieller Blutpool	140	4670
Lunge	670	4670
Magen	150	60
Dünndarm	640	600
Dickdarm	370	240
Pankreas	100	60
Milz	180	180
Leber	1710	390
Gallenblase	20	
Niere	720	1133
Gehirn	1486	700
Herz	330	240
Muskel	30200	550

Organ	Volumina [ml]	Blutflussraten [ml/min]
Knochen	12060	167
Haut	3020	50
Fett	10060	300
Hoden	35	2,6

Tabelle 3

Volumenanteil	f_vas	f_int	f_cell
Fettgewebe	0,010	0,135	0,855
Gehirn	0,037	0,004	0,959
Magen-Darm-Trakt	0,032	0,100	0,868
Herz	0,262	0,100	0,638
Niere	0,105	0,200	0,695
Leber	0,115	0,163	0,722
Lunge	0,626	0,188	0,186
Muskel	0,026	0,120	0,854
Knochen	0,041	0,100	0,859
Haut	0,019	0,302	0,679
Bauchspeicheldrüse	0,180	0,120	0,700
Milz	0,282	0,150	0,568
Hoden	0,140	0,069	0,791

Tabelle 4

Parameter	Wert	Einheit
Dosis	0,25	mg
Wasserlöslichkeit	65	mg/l
Intrinsische Leberclearance	0,48	ml/min/kg
Freie Fraktion in Plasma	0,73	-
Passive Darmwand-Permeabilität	$1,4 \cdot 10^{-6}$	cm/s

Tabelle 5

Organ	Organ/Plasma Verteilungs- koeffizient	Permabilitäts- Oberflächen- Produkt [ml/min]
Magen	8,34	100
Dünndarm	8,34	1000
Dickdarm	8,34	500
Pankreas	10,57	500
Milz	2,74	250
Leber	9,35	1000
Niere	7,19	1000
Lunge	1,97	0,3
Gehirn	14,21	0,002
Herz	13,28	1000
Muskel	2,33	1000
Knochen	34,45	28
Haut	13,49	0,33
Fett	100,42	14
Hoden	4,42	3

Tabelle 6

Organ	V _{max} [ml/min]	K _m [mg/l]
Duodenum	0,086	6,3
Jejunum	0,76	6,3
Ileum	1,13	6,3

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Dosierung von mindestens einem Wirkstoff auf Basis einer genetischen Analyse mit folgenden Schritten:

- Analyse (101) von spezifischen Gensequenzen, mittels eines gensequenz-spezifischen Analysengerätes, insbesondere eines sequenzspezifischen Sensors, oder Bestimmung der Expression von Proteinen entweder über RNA Transkription mittels quantitativer RNA-spezifischer Nachweismethoden oder direkte Messung der Proteinexpression durch ein Protein-Analysegerät
- Zuordnung der Gensequenzen zu physiologischen Funktionen des menschlichen oder tierischen Körpers, insbesondere solchen physiologischen Funktionen, die Einfluss auf den Abbau, auf die Aufnahme, auf die Abgabe oder auf das Verteilungsverhalten des Wirkstoffes im Körper haben,
- Weitergabe der genetischen und der Zuordnungsdaten an einen physiologie-basiertes Pharmakokinetisches Modell (PBPK-Modell) (108),
- Eingabe von Wirkstoff-spezifischen Daten in das PBPK-Modell (108),
- Eingabe von charakteristischen Patientendaten, gegebenenfalls aus direkten Messungen am Körper,

- f) Berechnung von für das PBPK-Modell notwendigen physiologischen Einflussparametern aus den Patientendaten unter Verwendung von in der Wissensdatenbank enthaltenen Informationen und Weitergabe der Parameter an das PBPK-Modell (108),
 g) Berechnung der individuellen Dosis aus den Daten nach den Schritten c), d) und f) unter Verwendung des PBPK-Modells (108).

2. Verfahren nach Anspruch 1, urch gekennzeichnet, dass die Gensequenzen ausgewählt sind aus solchen die die Proteine der Reihe:

Metabolisierende Enzyme, insbesondere Monooxygenasen der Cytochrome P 450 Familie, Phase II Enzyme, die polare Gruppen an die auszuscheidenden Moleküle anhängen, Aktive Transporter, insbesondere Multidrug Resistance Proteine z.B. P-Glycoprotein Familie oder Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP) oder Organic Anion Transporting Polypeptide Familie (OATP) oder Organic Anion Transporter Familie (OAT) oder Organic Cation Transporter Familie (OCT) oder Novel Organic Cation Transporter Familie (OCTN) oder Peptid Transporter Familie (PepT), oder Plasma Bindungs Proteine, insbesondere Serum Albumin und Glycoproteine betreffen.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die wirkstoffspezifischen Daten solche sind, die ausgewählt sind aus der Reihe:

Organ/Blut-Verteilungskoeffizienten, Membranpermeabilität, kinetische Konstanten der Metabolisierungsprozesse und/oder der aktiven Transportprozesse.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die charakteristischen Patientendaten gemäß Schritt e) ausgewählt sind aus der Reihe:

Körpergewicht, Körperoberfläche, Körperfettgehalt, Alter oder Geschlecht.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die physiologischen Einflussparameter gemäß Schritt f) ausgewählt sind aus der Reihe:

Durchflussrate Q_x von Blut durch das Organ X, Volumen V_x des Organs X oder Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt ($PxSA_x$) für das Organ X.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das PBPK-Modell ein Simulationsprogramm ist, das wenigstens die folgenden Funktionen simuliert: Darmaufnahme Bluttransport, Verteilung in Organe durch Permeation oder aktiven Transport, Metabolisierung, Ausscheidung über Urin oder Galle.

7. Vorrichtung zur Bestimmung der Dosierung von Wirkstoffen, insbesondere nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, aufweisend wenigstens ein gensequenz-spezifisches Analysengerät (101), eine hiermit verbundene Rechneinheit mit einem Programm umfassend ein pharmakokinetisches Modell (108), einer Wissensdatenbank (105) und Eingabemodulen (104) für Patientendaten, dadurch gekennzeichnet, dass als pharmakokinetisches Modell (108) das PBPK-Modell (108) eingesetzt wird.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

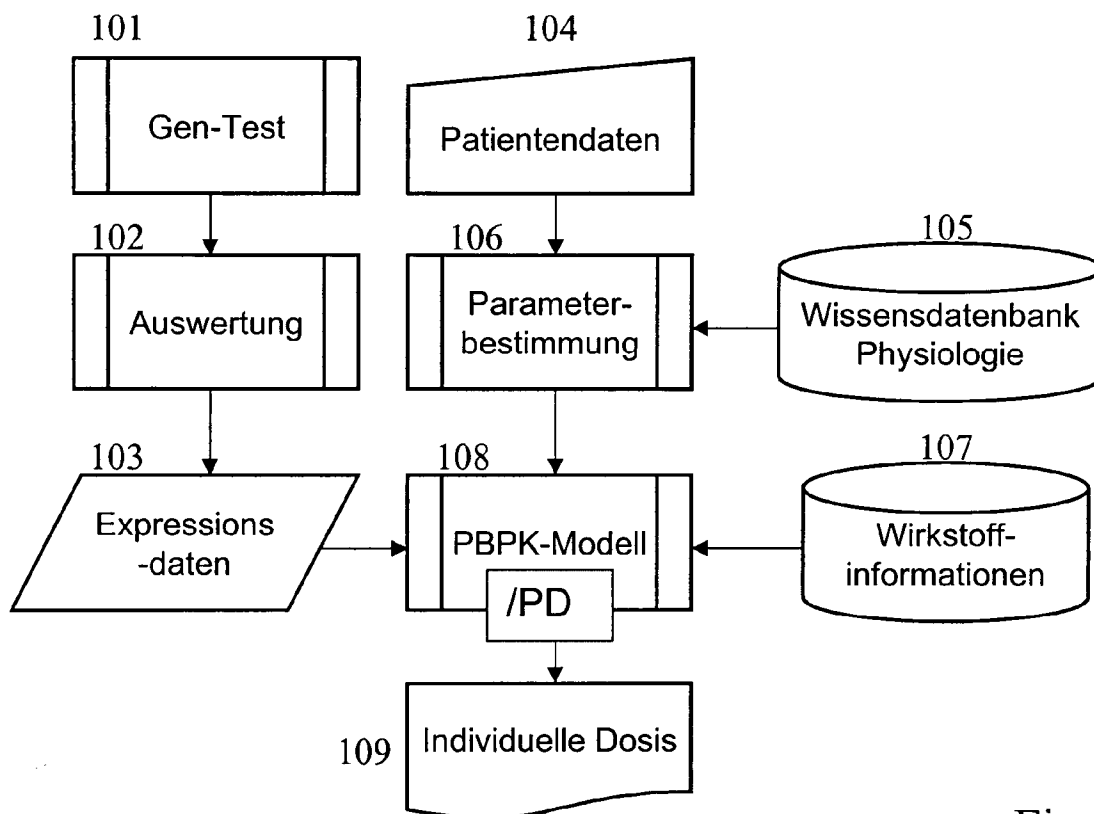
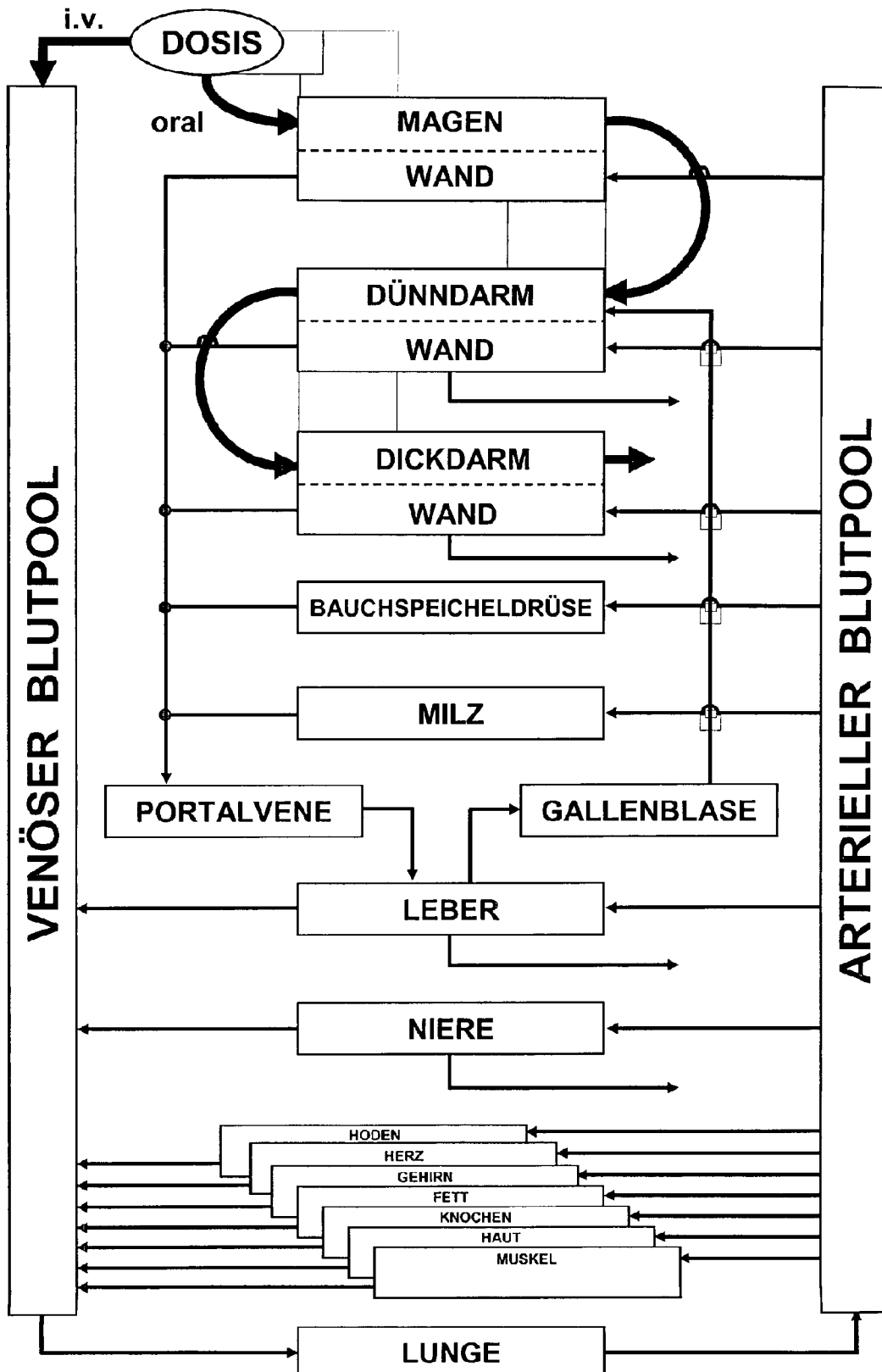


Fig.1

Figur 2



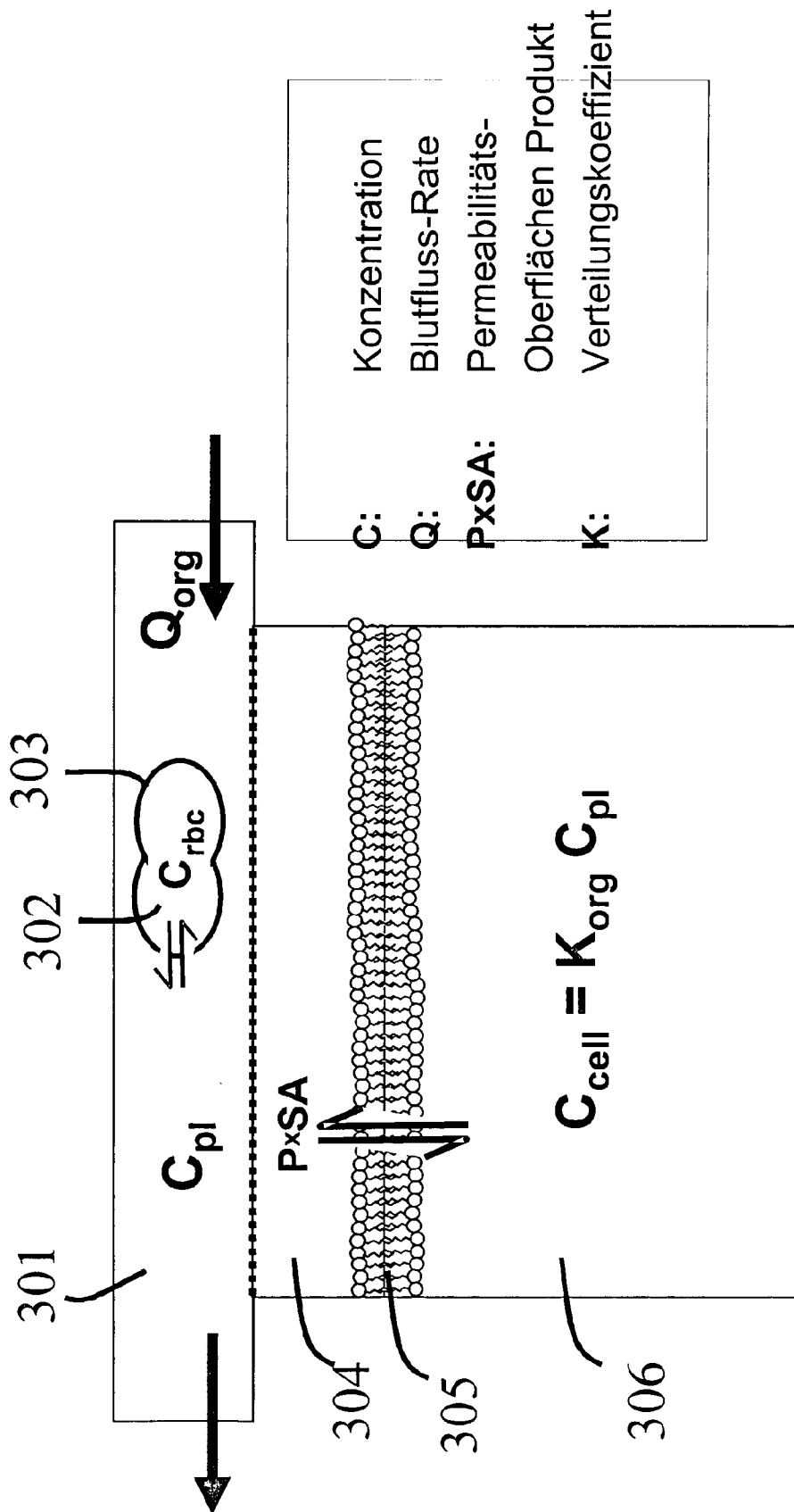


Fig.3

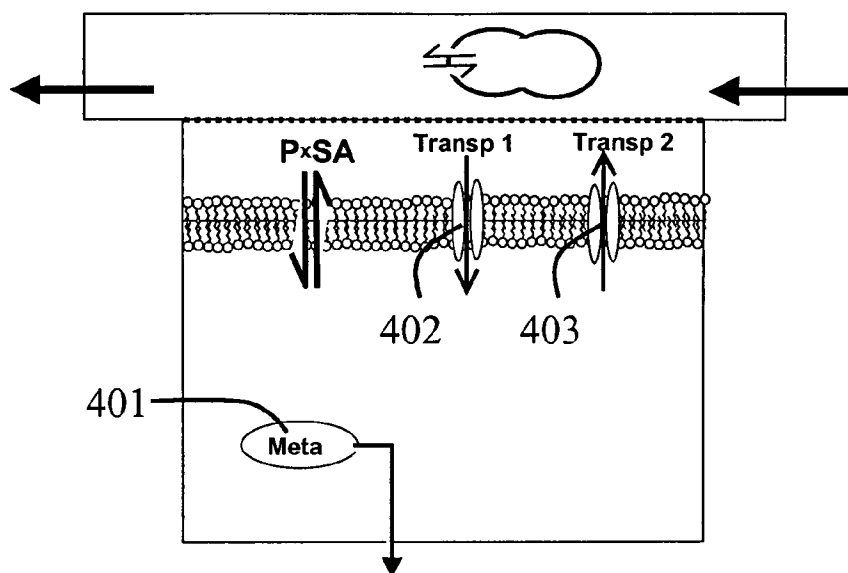


Fig. 4

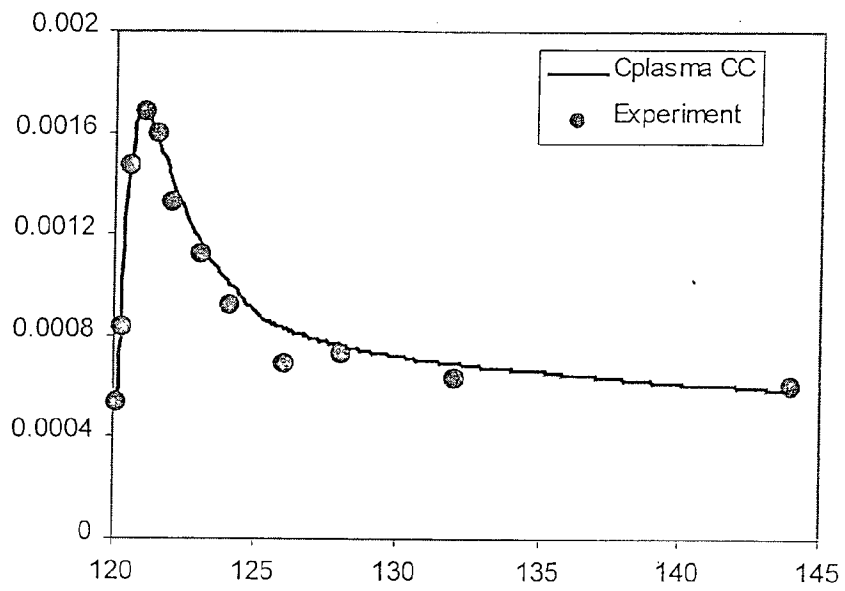


Fig. 5

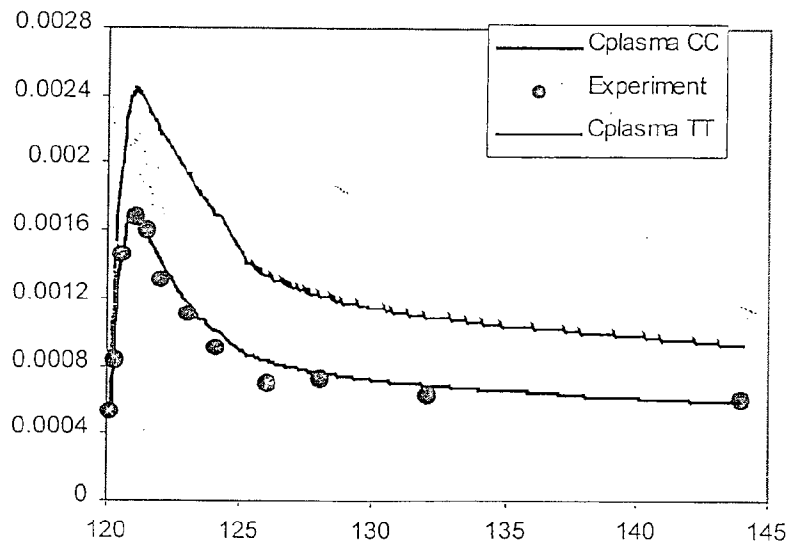


Fig. 6